

Desarrollo y optimización de una metodología para la determinación de metales y semimetales en cabello

Development and optimization of a methodology to determinate metals and semimetals in hair

RECIBIDO: 8/4/2019 → APROBADO: 20/5/2019 ✉ fiaquinta@fq.edu.uy

✉ IAQUINTA, FIORELLA (1); ÁLVAREZ, CRISTINA (2); COUSILLAS, ADRIANA (2); MAÑAY, NELLY (2)

(1) ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA, DEPARTAMENTO ESTRELLA CAMPOS, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, MONTEVIDEO, URUGUAY

(2) CEQUIMTOX, ÁREA TOXICOLOGÍA, DEPARTAMENTO ESTRELLA CAMPOS, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, MONTEVIDEO, URUGUAY

RESUMEN

La determinación de niveles de elementos traza en cabello como alternativa a otras matrices biológicas está siendo ampliamente utilizada en programas de biomonitorio como biomarcadores de exposición crónica a contaminantes ambientales y para evaluar patologías asociadas al exceso o carencia de determinadas sustancias. El cabello es una matriz compleja para análisis de trazas que presenta importantes desafíos analíticos y preanalíticos. Se presenta el desarrollo y validación de una metodología para la determinación de mercurio (Hg), plomo (Pb), arsénico (As) y manganeso (Mn) por espectrometría de absorción atómica. La digestión de la muestra se realizó mediante digestión asistida por microondas. El mercurio se determinó utilizando vapor frío (CV-AAS) y la generación de hidruros (HG-AAS) fue utilizada para el caso del arsénico. Las determinaciones de manganeso y plomo se realizaron por atomización electrotérmica (ET-AAS). Los parámetros de desempeño evaluados fueron rango lineal, límites de cuantificación y detección, precisión a tres niveles y veracidad. Este último fue evaluado utilizando un material de referencia certificado de cabello n°13 Human Hair, del Instituto Nacional de Estudios Ambientales (NIES) de Japón. La validación de esta metodología es de gran utilidad para el estudio de la exposición a estos analitos, dada la simplicidad de la obtención de la muestra.

PALABRAS CLAVE: Pelo, metales, semimetales, toxicología, espectrometría.

ABSTRACT

Hair is an alternative biological matrix widely used in biomonitoring programs. It is used as a biomarker of chronic exposure to environmental contaminants and to evaluate pathologies related to the excess or shortage of certain substances. Hair is a complex matrix for the evaluation of toxics in low levels. This matrix is an analytic and pre-analytic challenge. In this work, the development and validation of a methodology for the determination of mercury (Hg), lead (Pb), arsenic (As) and manganese (Mn) by atomic absorption spectrometry is presented. The sample treatment was carried out by microwave assisted digestion. The determination of Hg was carried out using cold vapor (CV-AAS) and hydride generation (HG-AAS) was used for As. Mn and Pb were analyzed by electrothermal atomization (ET-AAS). The figures of merit evaluated were linear range, limits of quantification and detection, accuracy at three levels and veracity. The latter was evaluated using a hair reference material (No. 13 Human Hair, from the National Institute of Environmental Studies-NIES, Japan). The validation of this methodology is very useful for the study of exposure to these analytes, because of the simplicity of sample obtention.

KEYWORDS: Hair, metals, semimetals, toxicology, spectrometry.

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la evolución, los organismos han incorporado elementos inorgánicos en sus sistemas biológicos. Dado que muchos de esos sistemas dependen de la presencia de estos elementos, se han considerado esenciales para el desarrollo de la vida. Un elemento es esencial cuando su ausencia o defecto causa problemas para el desarrollo del organismo, pero es capaz de revertirlos cuando se lo vuelve a incorporar en la dieta. La presencia de estos elementos debe ser equilibrada, ya que su exceso puede ser tóxico para la salud (Casarett, 2005).

El arsénico (As), el plomo (Pb) y el mercurio (Hg) son los tres primeros elementos de la lista prioritaria de sustancias peligrosas debido a su frecuencia, toxicidad y potencial de exposición humana en sitios contaminados (ATSDR, 2017). Estos elementos se consideran tóxicos sistémicos que inducen múltiples lesiones de órganos y varias enfermedades, que van desde problemas neurológicos a pigmentaciones o irritaciones en la piel, incluso a niveles bajos de exposición.

En el caso del As, hay varios estudios que correlacionan la exposición inorgánica del As con el desarrollo de cáncer de pulmón y de piel (Mañay, 2013), lo que ha llevado a que la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC) lo clasifique como cancerígeno para el hombre (IARC, 2018).

La toxicidad del plomo está ampliamente estudiada. Entre los efectos más característicos se encuentran la alteración de la síntesis del grupo hemo, que provoca la inhibición de la formación de hemoglobina, y problemas neurológicos. En el caso de los niños es una problemática de interés ya que provoca un comportamiento alterado, retraso mental, hiperactividad y sordera, entre otros trastornos. Estos efectos son

debidos a que el plomo cruza la barrera hematoencefálica más fácilmente en niños que en adultos (Casarett, 2005).

La exposición al Hg puede causar insuficiencia renal y pulmonar, e incluso la muerte. En su forma metilada es un agente teratogénico, ya que es capaz de cruzar la barrera placentaria, causando malformaciones en el feto (Colangelo, 2013). Otros estudios que correlacionan la exposición al metal demuestran sus propiedades de mutagénesis. Algunos trabajos correlacionan la exposición al metal con aberraciones cromosómicas (Azevedo, et al., 2003).

Otros oligoelementos metálicos como el Mn son nutrientes esenciales requeridos para diversas funciones bioquímicas y fisiológicas en dosis adecuadas. Sin embargo, altas concentraciones de Mn pueden causar problemas neurológicos (Menezes-Filho, et al., 2009). La intoxicación por este metal puede afectar las funciones motoras, causando un síndrome similar al Parkinson (Tokar, 2013).

La concentración de estos elementos en cabello es útil como biomarcador de exposición en programas de biomonitoreo como *screening*, o mapeo de riesgos para la salud de la población (WHO, 2015). El cabello se puede utilizar como una muestra muy conveniente para la evaluación de la exposición crónica, lo que muestra su gran potencial como herramienta clínica de evaluación de exposición histórica a ciertas sustancias a lo largo del tiempo (ATSDR, 2001). Otro de los beneficios del uso de esta matriz es la sencillez de su obtención, ya que no es una muestra invasiva como la sangre. Varios estudios se han realizado con esta matriz, principalmente para evaluación a la exposición ambiental (Tirado, et al., 2015; Liang, et al., 2017), pero también en estudios entre niños con autismo y sus madres (Adams, 2006).

Desde el punto de vista analítico, al ser una matriz compleja presenta un gran desafío preanalítico, porque se debe asegurar que los resultados obtenidos corresponden exclusivamente a la excreción del organismo y no a la exposición exógena. Para ello es necesario establecer un riguroso protocolo de toma y lavado de la muestra.

A los efectos de contar con niveles de referencia de estos metales/metaloides, el máximo nivel de As en el pelo es $1 \mu\text{g g}^{-1}$ según la Agencia para las sustancias tóxicas y registro de enfermedades (ATSDR; ATSDR, 2007). Sin embargo, los niveles de Pb en cabello de referencia no están bien definidos porque cambian según la región de estudio. En Latinoamérica, algunos trabajos realizados en Venezuela y Chile consignaron niveles entre $5,28$ y $7,70 \mu\text{g g}^{-1}$ (Marcano, et al., 2009; Valdebenito, 2008). En el caso del Hg, las Naciones Unidas sugieren niveles 1 a $2 \mu\text{g g}^{-1}$ para las personas que no han consumido pescado recientemente, mientras que valores de $10 \mu\text{g g}^{-1}$ pueden esperarse en personas que sí lo hicieron (Naciones Unidas, 2010).

En este trabajo se presenta el desarrollo, optimización y validación de una metodología para la determinación de As, Pb, Mn y Hg. La metodología requiere también la elaboración de un protocolo de muestreo y de preparación de muestras, que en este caso será asistida por microondas. Como se ha mencionado, esta matriz es ampliamente utilizada en programas de biomonitoreo, por lo cual su validación es de gran utilidad para evaluar los niveles de exposición poblacional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Las disoluciones se prepararon a partir de una disolución *stock* de 1000 mg L⁻¹ de cada analito Merck. Se utilizó ácido nítrico (HNO₃) ppa. Merck para las curvas de calibración y para digestión de la muestra en diluciones de 0,028 mol L⁻¹ (0,2% v/v) y 10,5 mol L⁻¹ (25% v/v), con agua tipo 2.

El modificador usado es fosfato de amonio monobásico (NH₄H₂PO₄), Carlos Erba. Para HG-AAS y CV-AAS, se utilizó borohidruro de sodio (NaBH₄) Aldrich, hidróxido de sodio (NaOH) pa. Panreac y ácido clorhídrico (HCl) pa. J. T. Baker. Para la reducción del As también se usó ioduro de sodio (NaI) Dolder.

Muestra

Para el desarrollo de la metodología se utilizó cabello donado por adultos sanos, no expuestos ocupacionalmente. Para evaluar algunas cifras de mérito se usó un material de referencia certificado, número 13 de cabello humano, del Instituto Nacional de Estudios Ambientales (NIES) de Japón.

Parámetros analíticos y equipos

La validación se realizó en el Centro Especializado de Química Toxicológica (CEQUIMTOX). La determinación de los elementos se hizo por espectrometría de absorción atómica. La determinación de Hg y As se llevó a cabo utilizando un equipo de espectrometría de absorción atómica Varian 55B, con un sistema de flujo de generación de vapor VGA 77 Agilent para cada elemento. La determinación de Hg se realizó por CV-AAS, y la de As por HG-AAS. Para la determinación se trabajó a 253,6 nm y a 193,7 nm, respectivamente.

Mn y Pb fueron analizados mediante ET-AAS utilizando un equipo de espectrometría de absorción atómica Thermo iCE serie 3000, con automuestreador y corrección de fondo Zeeman. La determinación se realizó en las líneas 283,3 nm y 279,5 nm, respectivamente.

Limpieza y digestión de las muestras

La limpieza de las muestras fue adaptada de Menezes et al. (2009). Se tomó una muestra de pelo de la nuca, de aproximadamente 0,5 cm de diámetro, y se cortó lo más próximo posible al cuero cabelludo con una tijera quirúrgica de acero inoxidable. Se tomó el centímetro de pelo del extremo del cuero cabelludo y se lo colocó en baño de ultrasonido durante 20 minutos con TritonX-100 al 1% m/v. La muestra se enjuagó con agua desionizada hasta que desapareciera la espuma. Luego se colocó nuevamente en un baño de ultrasonido durante 10 minutos con HNO₃ 1N y se enjuagó al menos tres veces con agua desionizada. A continuación se colocó

en una estufa a 80 °C durante 24 horas y posteriormente se almacenó en una bolsa plástica hasta su digestión.

Para la digestión de las muestras se evaluó el contenido de HNO₃ necesario para obtener una solución límpida y sin suspensiones. Se utilizaron diferentes concentraciones de HNO₃ (100% v/v, 50% v/v y 25% v/v). Finalmente, la digestión se realizó con 25 mg de pelo y 10 mL de HNO₃ 25% v/v, utilizando el método de digestión diseñado para cabellos incluido en el equipo de horno microonda Mars 6, CEM. El programa de temperaturas se presenta en la Tabla 1.

TABLA 1. Temperaturas del programa Hair.

Etapa	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)
Rampa de calentamiento	15	Hasta 180
Mantenimiento	15	180
Enfriamiento	15	40-50

Parámetros de desempeño

Debido a los niveles admitidos para los diferentes analitos se evaluó un rango lineal de 0 a 12,5 µg L⁻¹ para cada elemento. Se realizaron fortificaciones antes de las digestiones para evaluar la veracidad, además del uso del material de referencia certificado. El modelo de mejor ajuste se evaluó mediante inspección visual, coeficiente de determinación (R²) y la prueba *lack of fitness* (LOF). El efecto matriz fue evaluado con el material de referencia certificado para Pb, Hg y Mn (n=8). Dada la baja concentración del As en material de referencia, que no puede ser detectada por estas técnicas (EAA), la veracidad se evaluó mediante una prueba t-Student.

Los límites de cuantificación (LOQ) y límites de detección (LOD) se calcularon con los blancos (n=10), utilizando el criterio 10s y 3s (Eurachem, 2014). La precisión como repetibilidad se evaluó en tres niveles de concentración (3, 6 y 9 µg L⁻¹, n=10). La precisión intermedia se estudió para la variable tiempo comparando los valores medios. La veracidad se evaluó con un material de referencia certificado para el caso de Mn y Hg (n=8); para el As y Pb fue evaluada utilizando la recuperación en dos niveles diferentes de concentración (n=2), debido a la baja cantidad de As en el material, y al efecto matriz en Pb. La evaluación de la incertidumbre se realizó mediante el protocolo PLB05 del CEQUIMTOX, que establece que, en caso de contar con interlaboratorios, la incertidumbre (U) se calcula como el doble de la desviación estándar de la precisión intermedia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Condiciones CV-AAS

Se probaron las condiciones de generación de vapor frío utilizadas habitualmente en el CEQUIMTOX para la determinación de Hg en orina. Como los resultados eran adecuados (estabilidad y altura máxima de la señal) se utilizaron las mismas condiciones: flujo: 6 mL min⁻¹, HCl: 40% v/v, NaBH₄ 0,6% m/v en NaOH 0,5% m/v. Debido a la toxicidad de Hg es necesario preparar una trampa de Hg con permanganato de potasio para la captura del vapor de Hg.

Condiciones HG-AAS

Al igual que con CV-AAS, tanto la reducción de la muestra como las condiciones para la generación del hidruro se evaluaron por primera vez mediante la realización del protocolo utilizado habitualmente para la determinación de As en orina. Como los resultados fueron adecuados (estabilidad y altura máxima de la señal), las condiciones se mantuvieron: flujo: 6 mL min⁻¹, HCl 5N, NaBH₄ 0,6% m/v en NaOH 0,5% m/v. La reducción de As (V) a As (III) fue realizada agregando 1 mL de NaI 27% m/v y 1 mL de HCl conc. cada 10 mL de muestra.

Optimización de ET-AAS

Las condiciones de ET-AAS se optimizaron para Mn y Pb. No se necesitó ningún modificador de matriz para Mn, pero en el caso de Pb se utilizó fosfato de amonio de 5 g L⁻¹. Las temperaturas óptimas de pirólisis y atomización fueron 800/1900 °C, y 800/2200 °C para Mn y Pb, respectivamente. En las Tablas 2 y 3 se presentan los programas de temperatura utilizados.

TABLA 2. Programa de temperaturas mediante ET-AAS para la determinación de Mn.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Rampa	Flujo de gas (L/min)	Etapas
100	30	10	0,2	Secado
800	20	150	0,2	Pirólisis
1900	3	0	Apagado	Atomización
2000	3	0	0,2	Limpieza

TABLA 3. Programa de temperaturas mediante ET-AAS para la determinación de Pb.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Rampa	Flujo de gas (L/min)	Etapa
95	10	4	0,2	Secado
100	20	4	0,2	
130	5	2	0,2	
450	30	84	0,2	
800	5	5	0,2	Pirólisis
2200	2	0	Apagado	Atomización
2300	1	170	0,2	Limpieza

Rango de estudio

El rango de estudio fue de 0 a 12,5 µg L⁻¹. Debido a la falta de los valores límite del plomo en cabello se utilizaron como referencia los niveles encontrados en la región, de 6 a 8 µg g⁻¹. En el caso de As, Hg y Mn se utilizaron los valores de referencia antes mencionados, que están incluidos dentro del rango de estudio. La Figura 1 a-d muestra el mejor modelo de ajuste para cada elemento. Pb, Hg y As tienen un comportamiento lineal, pero el Mn presenta un modelo del mejor ajuste cuadrático. La Tabla 4 presenta los resultados obtenidos luego de realizar el LOF; como los resultados obtenidos (U) son menores al F, los modelos de ajuste elegidos son correctos.

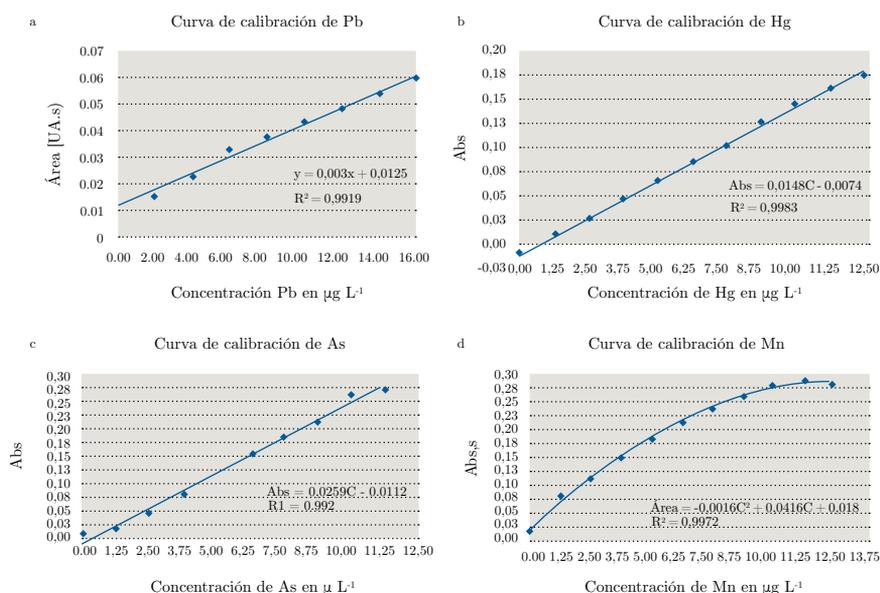


Figura 1. Curvas de calibración: a) Pb, b) Hg, c) As, d) Mn.

TABLA 4. Prueba de mejor ajuste (LOF).

	As	Pb	Hg	Mn
U	2,444	2,571	2,333	2,750
F, 0,95	3,049	3,160	3,049	3,049

Efecto matriz

Con el fin de evaluar el efecto matriz del As, se realizó una prueba t-Student comparando la curva de calibración en 0,2% v/v HNO₃ y la curva realizada con cabello y adiciones estándar a lo largo del rango lineal de estudio (n=3). Los resultados del test se presentan en la Tabla 5 e indican que no hay efecto matriz, por lo tanto, a efectos del análisis de rutina, la curva se realizará en esta disolución.

En el Pb se evaluó el efecto matriz utilizando el material de referencia certificado. El análisis se realizó en diferentes diluciones del material en HNO₃ 0,2% por duplicado, en curva de calibración de la misma disolución. Los resultados presentados en la Tabla 6 muestran que los valores de recuperación obtenidos para las distintas diluciones no se encuentran dentro del rango de aceptación estipulado (75-125% de recuperación), lo que evidencia el efecto matriz. Sin embargo, se realizó un estudio de coincidencia de matriz, *matrix match* (n = 7), utilizando el test de Chow, que indica que no hay diferencia alguna entre los diferentes cabellos, por lo que para realizar la curva de calibración se deberá utilizar cabello de población no expuesta (Tabla 7).

TABLA 5. Prueba *t* de dos colas para evaluar efecto matriz del As.

<i>t-estadístico</i>	<i>t-crítico</i>
1,13646784	2,77644511

Para Hg y Mn el efecto matriz también se evaluó utilizando el material de referencia certificado. Se hizo un duplicado de las diluciones y se interpoló en una curva de calibración en HNO₃ 0,2%, que se muestra en la Tabla 6, donde se pueden ver los porcentajes de recuperación de las diferentes diluciones, mostrando que no se evidencia efecto matriz.

Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ)

LOD y LOQ se calcularon siguiendo los criterios 3s y 10s, según la guía Eurachem (Eurachem, 2014), donde s es la desviación estándar de 10 medidas de blanco. La Tabla 8 presenta los resultados obtenidos. Los límites de As, Pb y Hg son adecuados para el uso de esta metodología de *screening*. Sin embargo, para el caso del Mn, el límite de cuantificación obtenido está por encima del valor con el que se ha encontrado la aparición de efectos adversos de 3 µg g⁻¹ de pelo en niños de Montreal (Menezes-Filho, et al., 2009). De todas formas, por ser la primera metodología

desarrollada para la determinación de este metal en cabello del país, se utilizará como *screening* mientras se trabaja para disminuirlo.

TABLA 6. Evaluación del efecto matriz.

	Mn		Pb		Hg	
	NIES 1	NIES 2	NIES 1	NIES 2	NIES 1	NIES 2
Dilución	% REC	% REC	% REC	% REC	% REC	% REC
1 / 20	87,80	96,15	-587,99	-471,50	50,72	93,84
1 / 15	131,71	115,38	17,26	43,63	86,81	99,40
1 / 10	97,56	105,77	45,27	57,22	95,04	108,83
1 / 9	96,59	108,17	24,54	50,32	112,01	118,84
1 / 8	109,27	115,38	44,60	63,03	113,19	121,11
1 / 7	105,85	111,06	43,82	66,82	116,38	122,23
1 / 6	105,37	98,08	38,91	60,82	122,05	121,79
1 / 5	100,00	105,77	23,85	50,08	129,58	116,97
1 / 4	101,46	100,00	47,59	66,47	126,58	118,85
1 / 3	93,66	100,96	49,28	68,99	131,63	106,94
1 / 2	81,95	78,85	45,70	59,47	132,66	95,03

TABLA 7. Estadístico de Chow para evaluar efecto matriz del Pb.

F	F _{crit}
1,08E - 15	2,8

Precisión

La precisión como repetibilidad se determinó a tres niveles (3, 6, 9 $\mu\text{g L}^{-1}$, n=10) para As y Hg. Para Mn y Pb, se determinó a dos niveles (6, 9, n=10 para Mn y n=7 para Pb), debido a que el LOQ era superior a 3 $\mu\text{g L}^{-1}$. Se evaluó utilizando el coeficiente de variación (CV%) y los resultados que se muestran en Tabla 8 son adecuados para la metodología.

En el caso de la precisión intermedia, se realizó un test de comparación de valores medios.

Veracidad

Para Mn y Hg, la veracidad se estimó utilizando el material de referencia NIES (n=8), como se muestra en la Tabla 8. La recuperación fue del 105,6% y 108,1%,

respectivamente. En el caso del As, este parámetro se estimó usando muestras de cabello fortificadas (n=4) a 3 y 6 $\mu\text{g L}^{-1}$. La recuperación en este caso fue de 106,5%. Debido al efecto de matriz en las curvas de calibración de Pb, no fue posible determinar la veracidad utilizando el material de referencia. La recuperación se estimó utilizando muestras fortificadas (n=4) a diferentes niveles, 6,25 y 12,50 $\mu\text{g L}^{-1}$. La recuperación obtenida para este analito fue del 91,9%.

Incertidumbre

Se evaluó en la metodología para tres niveles de concentración distintos, los mismos que fueron utilizados para precisión: 3, 6 y 9 $\mu\text{g L}^{-1}$. Los resultados se encuentran en la Tabla 8.

TABLA 8. Parámetros de desempeño.

Elemento	As	Pb	Hg	Mn
LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,121	0,961	0,249	1,319
LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,403	3,204	0,830	3,860
Precisión (CV%, n=10) (3 $\mu\text{g g}^{-1}$)	6,6	-	6,4	-
Precisión (CV%, n=10) (6 $\mu\text{g g}^{-1}$)	7,0	10,9 (n = 7)	7,8	4,9
Precisión (CV%, n=10) (9 $\mu\text{g g}^{-1}$)	5,5	6,4 (n = 7)	5,1	4,06
Veracidad (% recuperación)	106,5*	94,9**	108,1**	105,6*
Incertidumbre ($\mu\text{g L}^{-1}$) (3, 6, 9 $\mu\text{g L}^{-1}$)	0,4	-	0,3	-
	0,7	2,3	3,7	0,59
	1,3	2,6	0,9	0,85

* Material de referencia certificado Human Hair NIES; ** fortificaciones

CONCLUSIONES

Desde el punto de vista analítico, se logró desarrollar y validar un método de digestión y de determinación de cuatro elementos en una sola etapa de preparación de la muestra. Esto hace que se pueda contar con una herramienta analítica para estudios poblacionales en Uruguay.

Los elementos determinados en este estudio en la matriz cabello son ampliamente utilizados a nivel internacional como biomarcadores de exposición crónica, por lo cual se debe seguir avanzando e intentar mejorar los límites de detección y cuantificación, principalmente para el Pb y Mn en relación a los valores de referencia.

Se plantea como próximo desafío realizar un estudio preliminar en la población local para establecer los valores basales de estos elementos en cabello, propios de la población uruguaya.

REFERENCIAS

- Adams, L.B., Holloway, C.E., George, F. y Quig, D., 2006. Analyses of toxic metals and essential minerals in the hair of arizona children with autism and associated conditions, and their mothers. En: *Biological Trace Element Research*, 110(3), pp.193-209.
- ATSDR, 2007. *Toxicological profile for arsenic* [En línea]. Atlanta: ATSDR. [Consulta: 17 de noviembre, 2017]. Disponible en: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.pdf>
- ATSDR, 2017. *CERCLA Priority list of hazardous substances* [En línea]. Atlanta: ATSDR. [Consulta: 12 de marzo, 2019]. Disponible en: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/previous/07list.html>
- ATSDR, 2001. *Summary report hair analysis panel discussion exploring the state of the science* [En línea]. Atlanta: ATSDR. [Consulta: 5 de noviembre, 2017]. Disponible en: <https://www.ATSDR.cdc.gov/>
- Azevedo, F.A., de Souza Nascimento, E. y de MattaChasin, A. A., 2003. Mercurio. En: *Metals gerenciamento da toxicidade*. [s.l.]: Atheneu.
- Casarett, L.J. y Doull, J., 2005. *Fundamentos de toxicología*. Santiago de Compostela: Mc Graw-Hill/ Interamericana.
- Colangelo, C. H., 2013. Mercurio. En: Rojas Martínez, Maritza, coord. *Toxicología ambiental y ocupacional*. Bogotá: Universidad del Rosario. pp. 237-256
- Eurachem, 2014. *The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics* [En línea]. 2a ed. Torino: Eurachem. [Consulta: 15 de diciembre, 2017]. Disponible en: <https://eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>
- IARC, 2018. *List of classification, volume 1-123* [En línea]. Lyon: IARC. [Consulta: 3 de marzo, 2018] Disponible en: <https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications-volumes/>
- Liang, G., Pan, L. y Liu, X., 2017. Assessment of typical heavy metals in human hair of different age groups and foodstuffs in Beijing, China. En: *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(914), pp.1-10.
- Mañay, N., 2013. Arsénico y cadmio. En: Rojas Martínez, Maritza coord. *Toxicología ambiental y ocupacional*. Bogotá: Universidad del Rosario. pp. 257-276
- Marcano, E., Labady, M., Gomes, C., Aguiar, G. y Laine, J., 2009. Altos niveles de mercurio y plomo detectados por análisis de cabello en dos ambientes venezolanos. En: *Acta Amazonica*, 39(2), pp.315-318.
- Menezes-Filho, J.A., Paes, C.R., de Pontes, A., Moreira J.C., Sarcinelli, P.N. y Mergler, D., 2009. High levels of hair manganese in children living in the vicinity of a ferro-manganese alloy production plant. En: *Neurotoxicology*, 30(6), pp.1207-1213.
- Naciones Unidas, 2010. *Informe relativo a la información sobre los sistemas armonizados para medir la carga corporal de mercurio* [En línea]. Estocolmo: UNEP. [Consulta: 25 de marzo, 2018]. Disponible en: http://www.mercuryconvention.org/Portals/11/documents/meetings/inc2/spanish/INC2_6_s.doc

- Tirado Amador, L.R., González- Martínez, F.D., Martínez Hernández, L.J., Wilches Vergara, L. A. y Celedón-Suárez, J.N., 2015. Niveles de metales pesados en muestras biológicas y su importancia en salud. En: *Rev. Nac. de Odont.*, 11(21), pp.1-30.
- Tokar, E.J., Boyd, W.A., Freedman, J.H. y Waalkes, M.P., 2013. Toxic effects of metals. En: *Toxicology. The basic science of poisons*. 8va ed. Santiago de Compostela: Mc Graw-Hill.
- Valdebenito, G. A., 2008. *Desarrollo de un método para la determinación directa de Pb mediante espectrometría de absorción atómica electrotrémica (ETAAS) en suspensiones de pelo y uña («slurries») como biomarcadores de exposición* [En línea]. [s.l.]: Universidad de Chile. (Tesis de pregrado). [Consulta: 11 de noviembre, 2017]. Disponible en: <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/105699>
- WHO, 2015. *Human biomonitoring: facts and figures*. CopenhagEn: WHO Regional Office for Europe.