

DETERMINACIÓN DE HIERRO SÉRICO POR UN MÉTODO COLORIMÉTRICO Y ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN ATÓMICA CON PLASMA ACOPLADO POR INDUCCIÓN

*Jorge E. Caminos**, *Ismena Mockus**, *Inés Goenaga***, *Ernesto Díaz****, *Diana Avila*****.

* Unidad de Bioquímica, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Apartado Aéreo 14490, Ciudad Universitaria, Santafé de Bogotá. E-mail: imockus@multiphone.net.co

** Unidad de Hematología, Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Hospital San Juan de Dios, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá

*** Instituto Nacional de Medicina Legal, Santafé de Bogotá

**** Departamento de Química, Universidad Distrital, Santafé de Bogotá.

RESUMEN

Se determinaron los niveles séricos de hierro por espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado por inducción (ICP-AES) y colorimetría (hierro-fereno) en treinta niños bogotanos, de 9 años de edad, clínicamente sanos. Por espectrometría una tercera parte de la población presentó sideremias inferiores a 60 µg/dL, mientras que por colorimetría solamente un niño evidenció concentraciones bajas de hierro. Puesto que la deficiencia de hierro, aún en ausencia de anemia, se acompaña de alteraciones del crecimiento corporal y del aprendizaje, nuestros resultados sugieren la necesidad de evaluar las técnicas que actualmente se utilizan en los laboratorios clínicos del país para la medición de este micronutriente.

Palabras clave: Hierro sérico - Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado por inducción - Colorimetría (hierro-fereno).

SUMMARY

SERUM IRON DETERMINATION BY A COLORIMETRIC METHOD AND BY INDUCTIVELY COUPLED PLASMA ATOMIC EMISSION SPECTROMETRY

Serum iron levels were measured by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) and colorimetry (iron-ferene) in thirty clinically healthy nine years old children living in Bogotá. With the spectrometric method, one third of the population displayed serum iron levels lower than 60 µg/dL, whereas with the colorimetric method only one child showed an iron concentration under this level. Since iron deficiency, even when anemia was not present, has been associated with body growth and cognitive alterations, our results support the need of evaluating the techniques that are being used in colombian clinical laboratories for the measurement of this micronutrient.

Key words: Serum iron - Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry - Colorimetry (iron-ferene)

INTRODUCCIÓN

El hierro es un elemento indispensable para la síntesis de la porción hemo de la hemoglobina y de la mioglobina. También es necesario en proteí-

Recibido para evaluación:
Aprobado para publicación:

Diciembre de 1998
Mayo de 1999

nas férricas sin grupo hemo y en moléculas intracelulares como citocromos. Dada su reactividad, el hierro es empleado en múltiples reacciones bioquímicas y la actividad de un amplio número de enzimas involucradas en ellas se reduce durante la deficiencia de este mineral (1). La carencia de hierro conduce en primer lugar a una disminución de las reservas de este mineral, seguida por una reducción de la eritropoyesis lo que conduce a un descenso de las concentraciones de hemoglobina y a la reducción del transporte de oxígeno a las células. Además se presenta una baja de las concentraciones de mioglobina, de la actividad de la citocromo oxidasa y del transporte de electrones. La disminución de mioglobina y otras proteínas que contienen hierro en el músculo esquelético provocan una reducción de la capacidad aeróbica del músculo (2). Las manifestaciones clínicas de la deficiencia de hierro varían según el grado de carencia e incluyen disminución del crecimiento corporal (3) y problemas de aprendizaje (4,5). La deficiencia de hierro se acompaña de una disminución de la resistencia a las infecciones causada por una reducción de la acción de los fagocitos sobre las bacterias y a una disminución de la proliferación de las células T. Esto se presenta antes de observarse una disminución de los niveles sanguíneos de hemoglobina y es debido a un descenso de la actividad de la ribonucleótido reductasa y la mieloperoxidasa (6).

La deficiencia de hierro es debida principalmente a una ingesta que no supe las necesidades de los individuos y constituye la carencia de micronutrientes más frecuente en la tierra (7). Se presenta en países desarrollados y en vía de desarrollo; se calcula que más de 2 billones de personas en el mundo padecen de deficiencia de hierro y que más de la mitad de ellas son anémicas (8).

La deficiencia de hierro ha sido determinada, en el transcurso de los años, mediante múltiples métodos: cálculo de la ingesta diaria de hierro, estudio de la morfología del eritrocito, hematocrito, hemoglobina, hemoglobina celular promedio, volumen celular promedio, índice eritrocitario promedio, protoporfirina eritrocitaria libre, hierro sérico, capacidad total de unión del hierro, transfe-

rrina sérica, saturación de la transferrina, ferritina sérica y receptores de la transferrina sérica. Estos métodos varían considerablemente en sensibilidad y especificidad (9,10).

La carencia de este micronutriente se observa con mayor frecuencia en mujeres embarazadas y en infantes menores de 2 años, pero su prevalencia es también significativa en los niños de edad escolar (11,12). Dada la importancia y la factibilidad de la suplementación de hierro en la anemia ferropénica y en la deficiencia de hierro, es necesario disponer de herramientas adecuadas que permitan su diagnóstico. En el presente trabajo se pretende estudiar los niveles de hierro sérico por dos técnicas: espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado por inducción (13,14) y colorimetría (formación del complejo azul hierro - fereno) (15), correlacionar estos dos métodos y establecer posibles relaciones con los niveles de hemoglobina y hematocrito.

PARTE EXPERIMENTAL

El trabajo se inició, previa autorización de los padres, con 37 niños de 9 años de edad, clínicamente sanos, voluntarios, que respondieron a una convocatoria realizada entre los alumnos de segundo a cuarto grado de primaria de una escuela pública de Santa Fe de Bogotá.

Se trabajó con la edad centrada; se estudiaron individuos con edades mayores a 8.5 años y menores o iguales a 9.5 años.

Después de un ayuno de 12 horas, se les tomó muestra de sangre venosa en tubos vacutainer secos y en tubos con citrato - libres de contaminación exógena de metales-. Las muestras fueron centrifugadas a 3000xg durante 5 minutos. Se eliminaron las muestras hemolizadas. Cada uno de los sueros fue distribuido en dos alícuotas, para la medición de hierro por espectrometría de emisión atómica (13,14) y por método colorimétrico (15). Se descartaron 7 sujetos porque sus muestras fueron insuficientes para realizar todos los estudios o por presencia de hemólisis.

Los niveles séricos de hierro fueron determinados en un equipo Perkin-Elmer, modelo Optima

3000, mediante la técnica de espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado por inducción (ICP-AES). Se utilizó una solución patrón multielementos, incluyendo hierro (ICP-Mehrelement-standardlösung I (Merck-15474)). Se seleccionó la banda correspondiente a la longitud de onda de 259.94 nm de acuerdo a recomendaciones del fabricante del equipo. El equipo presenta una linealidad de 4 órdenes de magnitud (es decir que la respuesta del detector es proporcional linealmente a la concentración del analito, en un rango que comprende de 1 hasta 10000. En este rango, la respuesta del detector es función de la concentración del analito sometiéndose a la ley de Lambert-Beer). La curva de calibración presenta un coeficiente de correlación de 0.99995 para concentraciones entre 1 y 16000 ppb (partes por billón). Cada uno de los patrones y de las muestras es analizado seis veces. El procesamiento de los datos se desarrolla en el software del equipo Optima 3000 (ICP-Winlab). Con esta técnica, los coeficientes de variación intra-ensayo son menores al 3.5%.

El método colorimétrico para determinar el hierro sérico empleó la formación del complejo azul hierro - fereno (A-GENT[®] IRON, ABBOT LABORATORIES DIAGNOSTICS DIVISION) el cual fue leído en el equipo ABBOTT SPECTRUM[®] de acuerdo a las recomendaciones de la casa matriz. La variación intra-ensayo es menor o igual al 3%. El equipo se somete a calibración con un patrón suministrado por la casa matriz (ABBOTT A-GENT Iron Stock Standard). El equipo presenta una linealidad de 2 órdenes de magnitud con una correlación de 0.96.

El valor límite de 60 µg / dL de hierro sérico es utilizado para dividir a los sujetos en normales y deficientes (16).

La hemoglobina fue determinada por el método espectrofotométrico de Drabking (17). El hematocrito fue establecido por centrifugación en presencia de anticoagulantes.

El estudio estadístico se realizó utilizando el test t de Student y el coeficiente de correlación de Pearson. Se consideró significancia estadística a partir de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Se realizaron todos los exámenes en 30 sujetos, de los cuales 13 eran mujeres y 17 varones.

Los promedios y los rangos de hemoglobina, hematocrito, sideremia obtenida por método colorimétrico y por espectrometría de emisión atómica se reportan en la Tabla 1.

No se observaron diferencias significativas en los niveles de hemoglobina, hematocrito, sideremia determinada por colorimetría y espectrometría entre los 2 sexos (Tabla 2).

Se encontró una correlación entre los niveles de sideremia determinados por los 2 métodos ($r = 0.56$, $p < 0.001$). El contenido de hemoglobina y el hematocrito no se correlacionaron con los niveles de sideremia obtenidos por colorimetría, ni con los observados mediante espectrometría de emisión atómica. A su vez, los niveles de hematocrito se correlacionaron con los de hemoglobina ($r = 0.91$, $p < 0.0001$).

Según la técnica de espectrometría de emisión atómica 10 sujetos presentaron concentraciones séricas de hierro por debajo de 60 µg / dL, mientras que por el método colorimétrico se observaron niveles de hierro inferiores a este valor únicamente en un sujeto (Tabla 3).

Tabla 1. Sideremia, hemoglobina y hematocrito en la población estudiada

Determinación	Niveles*
Sideremia (espectrometría) µg / DL	71 ± 24 (32 - 134)
Sideremia (colorimetría) µg / dL	107 ± 27 (43 - 156)
Hemoglobina G / dL	14.2 ± 1.2 (12.0 - 16.5)
Hematocrito %	45.7 ± 3.5 (39.0 - 54.0)

*Los resultados se expresan como promedio ± DS.

Los rangos aparecen entre paréntesis (nivel mínimo - nivel máximo)

Tabla 2. Sideremia, hemoglobina y hematocrito en los 2 sexos

Determinación	Varones*	Mujeres*
Sideremia (espectrometría) $\mu\text{g} / \text{dL}$	74 ± 25 (40 - 134)	67 ± 21 (32 - 96)
Sideremia (colorimetría) $\mu\text{g} / \text{dL}$	109 ± 31 (43 - 156)	104 ± 22 (64 - 135)
Hemoglobina g / dL	14.3 ± 1.1 (12.0 - 16.5)	13.9 ± 1.3 (12.0 - 15.4)
Hematocrito %	46.0 ± 3.6 (40.0 - 54.0)	45.4 ± 3.6 (39.0 - 50.0)

* Los resultados se expresan como promedio \pm DS. Los rangos aparecen entre paréntesis (nivel mínimo - nivel máximo).

Tabla 3. Sideremia, hemoglobina y hematocrito en los sujetos agrupados según el punto de corte de $60 \mu\text{g} / \text{dL}$ de sideremia (espectrometría)

	Sideremia < $60 \mu\text{g} / \text{dL}$	Sideremia $\geq 60 \mu\text{g} / \text{dL}$
Número de sujetos	10	20
Sideremia (espectrometría) $\mu\text{g} / \text{dL}$	46 ± 8 (32 - 58)	83 ± 18 * (62 - 134)
Sideremia (colorimetría) $\mu\text{g} / \text{dL}$	93 ± 31 (43 - 144)	114 ± 23 (81 - 156)
Hemoglobina g / dL	14.3 ± 1.0 (12 - 16)	14.1 ± 1.3 (12 - 16.5)
Hematocrito %	46.2 ± 3.8 (39 - 54)	45.5 ± 3.5 (40 - 50)

Los valores se expresan como promedio \pm DS. Los rangos aparecen entre paréntesis (nivel mínimo - nivel máximo).

Significancia estadística: * $p < 0.0001$

DISCUSIÓN

Los niveles promedio de hierro sérico ($71 \pm 24 \mu\text{g} / \text{dL}$) obtenidos en el presente estudio, por espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado por inducción se asemejan a los observados en una investigación realizada en Venezuela, en la que por medio de espectrometría de absorción atómica se determinaron concentraciones de $70 \pm 23 \mu\text{g} / \text{dL}$ en una población de niños de 9 años (18). No se observan, al igual que en el estudio venezolano, diferencias entre los dos sexos.

Por otra parte en un estudio realizado en Norteamérica que incluía 17 adultos voluntarios sanos, se determinaron las concentraciones séricas de hierro por medio de un método colorimétrico recomendado por el Comité Internacional para la Estandarización en Hematología encontrándose

niveles promedio de $75 \pm 28 \mu\text{g} / \text{dL}$ (10), lo que se asemeja al resultado obtenido en el presente estudio por espectrometría de emisión atómica.

En este trabajo se determinan los niveles séricos de hierro por espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado por inducción y una técnica colorimétrica. Si bien se encuentra una correlación entre los dos métodos, se observa que de los 10 sujetos en los que se detectan niveles bajos de hierro ($< 60 \mu\text{g} / \text{dL}$) por espectrometría de emisión atómica, sólo uno presenta concentraciones disminuidas de este micronutriente por la técnica colorimétrica. Lo anterior podría ser debido a menores interferencias en las técnicas espectrométricas respecto a las colorimétricas. De todas maneras es necesario mencionar que dado el menor costo de los equipos y facilidad de manejo de las muestras los métodos colorimétricos para la determinación de hierro sérico son más ampliamente utilizados en los laboratorios clínicos.

Los niveles de hemoglobina no se correlacionan con los de hierro. En un trabajo previo (19) se demostró la poca utilidad de la determinación de hemoglobina para detectar individuos deficientes en hierro cuando se midieron parámetros como concentración de ferritina y concentraciones promedio de protoporfirina eritrocitaria. En el presente estudio, ningún niño presenta niveles de hemoglobina por debajo de $12 \text{g} / \text{dL}$, límite inferior de normalidad según varios autores (16,19). Lo que permite concluir que si bien parte de nuestra población es deficiente en hierro, el grado de carencia no es lo suficientemente severo para provocar anemia ferropénica. De todas maneras, es necesario recalcar que se han demostrado efectos benéficos de la administración de suplementos de

hierro en el rendimiento escolar de los individuos que presentan deficiencia de este micronutriente aún sin anemia ferropénica (20).

En conclusión en el presente estudio no se detectan niveles bajos de hemoglobina o hematocrito que permitan considerar el diagnóstico de anemia en los sujetos evaluados. Cuando se emplea la técnica de espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado por inducción, se observa que una tercera parte de la población estudiada presenta una deficiencia de hierro sérico, mientras que por colorimetría se detecta carencia de este mineral únicamente en uno de los treinta sujetos valorados. Por lo tanto se considera necesario interpretar con cautela los resultados de los niveles séricos de este micronutriente obtenidos mediante técnica colorimétrica (formación del complejo azul hierro - fereno) y evaluar los diferentes métodos colorimétricos que vienen siendo utilizados en los laboratorios clínicos del país.

Agradecimientos

Los autores expresan su gratitud a los niños que participaron en el presente estudio, a la Dras. Aurora Silva e Isabel Riveros. Además agradecen el apoyo económico brindado por el CINDEC, Universidad Nacional de Colombia.

BIBLIOGRAFÍA

- Bothwell. Overview and mechanism of iron regulation *Nutr. Rev.* **53**, 237 (1995).
- Beard, H. Dawson, D.J. Piñero. Iron metabolism: a comprehensive review. *Nutr. Rev.* **54**, 295 (1996).
- Chwang, A.G. Soemantri, E. Pollitt. Iron supplementation and physical growth of rural Indonesian children. *Am. J. Clin. Nutr.* **47**, 496 (1988).
- Andraca, M. Castillo, T. Walter. Psychomotor development and behavior in iron-deficient anemic infants. *Nutr. Rev.* **55**, 125 (1997).
- Pollitt. Iron deficiency and educational deficiency. *Nutr. Rev.* **55**, 133 (1997).
- Walter, M. Olivares, F. Pizarro, C. Muñoz. Iron, anemia, and infection. *Nutr. Rev.* **55**, 111 (1997).
- Underwood. From research to global reality: the micronutrient story. *J. Nutr.* **128**, 145 (1998).
- Freire W., Strategies of the Pan American Health Organization/World Health Organization for the control of iron deficiency in Latin America. *Nutr. Rev.* **55**, 183 (1997).
- Tershakovec, S.C. Weller. Iron status of inner-city elementary school children: lack of correlation between anemia and iron deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**, 1071 (1991).
- Ferguson, B.J. Skikne, B.S. Simpson, K.M. Baynes, R.D. Cook, J.D. Serum transferrin receptor distinguishes the anemia of chronic disease from iron deficiency anemia. *J. Lab. Clin. Med.* **19**, 385 (1992).
- Viteri. Iron supplementation for the control of iron deficiency in populations at risk. *Nutr. Rev.* **55**, 195 (1997).
- Stoltzfus, M. Albonico, J.M. Tielsh, H.M. Chwaya, L. Savioli. Linear growth retardation in Zanzibari school children. *J. Nutr.* **127**, 1099 (1997).
- Carrión, A. Itriago, M. Murillo, E. Eljuti, A. Fernández. Determination of calcium, phosphorus, magnesium, iron, copper and zinc in maternal milk by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **9**, 205 (1994).
- Itriago, N. Carrión, A. Fernández, M. Puig, E. Dini. Contenido de zinc, cobre, hierro, calcio, fósforo y magnesio en leche materna en los primeros días de lactación. *Arch. Latinoamer. Nutr.* **47**, 14 (1997).
- Higgins. Novel chromogen for serum iron determinations. *Clin. Chem.* **27**, 1619 (1981).
- Rosado, H. Bourges, B. Saint-Martin. Deficiencia de vitaminas y minerales en México. Una revisión crítica del estado de la información: I. Deficiencia de minerales. *Salud Pública Mex.* **37**, 130 (1995).
- Ridwan, W. Schultink, D. Dillon, R. Gross. Effects of weekly iron supplementation on pregnant Indonesian women are similar to those of daily supplementation. *Am. J. Clin. Nutr.* **63**, 884 (1996).
- Alarcón, J.R. Fuller, T.M. Silva, C. Angarita, E. Terán, M. Navas, P. Solano, M. Agostinelli. Serum level of Zn, Cu and Fe in healthy schoolchildren residing in Mérida, Venezuela. *Arch. Lat. Nutr.* **47**, 118 (1997).
- Expert Scientific Working Group. Summary of a report on assessment of the iron nutritional status of the United States population. *Am. J. Clin. Nutr.* **42**, 1318 (1985).
- Bruner, A. Joffe, A.K. Duggan, J.F. Cassella, J. Brandt. Randomised study of cognitive effects of iron supplementation in non-anaemic iron-deficient adolescents girls. *Lancet.* **348**, 992 (1996).